

## Bestimmung der freien Katecholamine im Harn

Von H. WISSER

*Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München*

(Eingegangen am 31. Juli 1970)

Es wird über ein teilautomatisches Bestimmungsverfahren von Adrenalin und Noradrenalin im Urin berichtet. Dazu wurde das Verfahren von WEIL-MALHERBE und BIGELOW (1, 2) mit geringen Änderungen auf den AutoAnalyzer adaptiert. Der Einfluß der Kupferionen bei der Bestimmungsreaktion wurde untersucht. Die Zuverlässigkeitskriterien der Methode wurden ermittelt. Verschiedene Parameter des Abtrennverfahrens von CROUT (3) wurden geprüft. Es wurden Untersuchungen zur Verwahrung von Säuleneluates durchgeführt. Die 24-Stdn-Ausscheidung von Adrenalin, Noradrenalin, Gesamtkatecholaminen und Dopamin wurde bei einer Stichprobe von 47 Frauen und 51 Männern unter statistischer Qualitätskontrolle bestimmt. Die Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Größen untereinander wurden berechnet. Es wird über die Ausscheidung der genannten Verbindungen sowie der Vanillinmandelsäure im 24-Stdn-Urin eines Patienten mit einem operativ gesicherten Phäochromocytom berichtet.

### *The determination of free catecholamines in urine*

A semiautomatic method is reported for the determination of adrenaline and noradrenaline in urine. The method of WEIL-MALHERBE and BIGELOW (1, 2) has been slightly modified and adapted for the AutoAnalyzer. The effect of copper ions on the determination method was investigated. The criteria of reliability for the method are reported. Different parameters of the separation method of CROUT (3) were tested. Studies were made on the preservation of column eluates. The 24 hr excretion of adrenaline, noradrenaline, total catecholamines and dopamine was determined with statistical quality control on a random sample of 47 women and 51 men. The correlation coefficients were calculated for the individual values as a group. The excretion of the above compounds and vanillinmandelic acid is reported in the 24 hr urine of a patient with an operatively confirmed phaeochromocytoma.

Unter dem Sammelbegriff Katecholamine werden die Verbindungen Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin<sup>1)</sup> zusammengefaßt. Diese Substanzen werden in unterschiedlicher Menge im 24-Stunden-Urin ausgeschieden. Die quantitative Bestimmung im Urin wird meist — nach Abtrennung an Aluminiumoxid oder Ionenaustauschern — fluorometrisch mit der Trihydroxiindolmethode durchgeführt. Die erwähnte Abtrennung ist eine Reinigungsschromatographie und führt nicht zu einer Auftrennung in die einzelnen Verbindungen. Eine vollständige Auftrennung in die Einzelkomponenten, z. B. mit Ionenaustauschern, ist so zeitaufwendig (4), daß man bei der differentiellen Bestimmung darauf verzichtet. Die spektralen Eigenschaften des Dopaminfluorophors gestatten eine Bestimmung von Dopamin neben Adrenalin und Noradrenalin. Zur differentiellen Adrenalin- und Noradrenalinbestimmung werden Unterschiede der optischen Eigenschaften der Fluorophore (5, 6, 7), des stabilisierenden Einflusses verschiedener Reduktionsmittel (8, 9, 10, 11), sowie die pH-Abhängigkeit der Oxydation benutzt (3, 7, 12).

Das erste teilautomatische Bestimmungsverfahren für Adrenalin und Noradrenalin wurde von MERRILLS eingeführt (8, 9). Diese von verschiedenen Autoren (13, 14, 15) angewandte Methode hat den Nachteil, daß die kleinste Größe, das Adrenalin, aus der Differenz zweier großer Meßwerte, den Gesamtkatecholaminen und dem Noradrenalin, ermittelt wird. Das Gleiche gilt auch für ein ähnliches Verfahren von VIKTORIA und Mitarbeitern (16). Von MABRY und WARTH (17) wurde eine teilautomatische Bestimmung mit Oxydation bei zwei ver-

schiedenen pH-Werten durchgeführt, wobei Adrenalin durch Oxydation bei pH 3,5 und Ascorbatzugabe bestimmt wird. Nachteilig bei dieser Methode ist, daß die Fluoreszenzintensität des Adrenalins nach Oxydation bei saurem pH-Wert mit Kaliumhexacyanoferrat-[III] und anschließendem Zusatz einer alkalischen Lösung von Ascorbinsäure oder Dimercaptopropanol niedrig ist (2). Führt man die Oxydation bei pH 2,8 unter Zusatz von Kupferionen durch, wobei 2-Mercaptoäthanol als Reduktionsmittel benutzt wird, so erhält man nach WEIL-MALHERBE und BIGELOW (1) eine erheblich größere Fluoreszenzausbeute. Diese Erhöhung der Fluoreszenzausbeute durch Kupferionen wurde auch von anderer Seite bestätigt (18). Diese für die Adrenalinbestimmung günstigen Bedingungen — differentielle Bestimmung durch Oxydation bei zwei verschiedenen pH-Werten und hohe Fluoreszenzausbeute — waren der Grund, das Verfahren von WEIL-MALHERBE und BIGELOW für eine Automation auszuwählen. Die Automation der Bestimmung hat den Vorteil, daß die Gefahr der Einschleppung von Störsubstanzen durch Glasgeräte vermindert und die zeitliche Konstanz der Abfolge von Reagenzienzugabe und Fluoreszenzmessung („timing“) gewährleistet ist. Außerdem ist das Verfahren weniger arbeitsintensiv. Dieser letzte Punkt macht sich besonders bei größeren Meßreihen bemerkbar.

### Methodik

Die Methode der *Dopaminbestimmung* wurde schon in dieser Zeitschrift veröffentlicht (19)<sup>2)</sup>, so daß auf die dort angegebenen Daten

<sup>1)</sup> Dopamin = *o*-Dihydroxyphenyläthylamin, Dopa = *o*-Dihydroxyphenylalanin.

<sup>2)</sup> In dem dort angegebenen Fließschema ist ein Fehler. Über die Position 2 wird die Probe (0,035'') und Position 4 (0,045'') der Puffer zugeführt.

verwiesen wird. Für die Bestimmung der übrigen Meßgrößen wird nochmals eine ausführliche Beschreibung gegeben<sup>3)</sup>. Gegenüber dem Verfahren von WEIL-MALHERBE (1, 2) sind folgende geringfügige Änderungen vorgenommen worden. Als Reduktionsmittel wird nur eine wäBr. 2-Mercaptoäthanol-Lösung ohne Natriumsulfit-Zusatz benutzt. Außerdem wird die Probe nach Zusatz der Thiolat-Lösung nicht auf pH 5,0 eingestellt. Das Ansäuern der Probe führt zu einer Zunahme der Stabilität des Fluorophors. Bei einer semiautomatischen Bestimmungsmethode mit einem exakten „timing“ ist dies nicht unbedingt notwendig. Außerdem fällt in Anwesenheit von Kupfer nach dem Ansäuern ein weißer Niederschlag (1) aus, der bei einem kontinuierlichen Bestimmungsverfahren durch Einbeziehung eines Dialyseschlitts entfernt werden müßte. Es sei vorweggenommen, daß für die Adrenalin-, Noradrenalin- und Gesamtkatecholaminbestimmung das gleiche Fließschema (Abb. 1) benutzt wird. Bei der Analyse des Normalkollektivs waren die Volumina so gewählt, daß nach Aliquotierung der Probe und Einstellen des pH-Wertes auf 2,8 bzw. 6,0 aus dem letzteren Teil für jede Urinprobe Noradrenalin, Gesamtkatecholamine und Dopamin bestimmt werden konnten.

*Adrenalin* wird bei pH 2,8 mit Kaliumhexacyanoferrat-[III] unter Zusatz von Kupferionen oxydiert, Noradrenalin bei pH 6,0 ohne Kupferionenzusatz. Die Bildung der Fluorophore erfolgt in alkalischer 2-Mercaptoäthanol-Lösung.

Zur Bestimmung der *Gesamtkatecholamine* wird das auf pH 6,0 eingestellte Eluat mit Kaliumhexacyanoferrat-[III] oxydiert. Die Fluorophorbildung wird durch Zusatz einer alkalischen Ascorbinsäurelösung ermöglicht.

*Dopamin* wird durch Oxydation mit Natrium-meta-perjodat und anschließendes Zufügen einer alkalischen Natriumsulfitlösung in die fluoreszierende Verbindung überführt.

#### Fluorometrische Messungen

##### Apparate und Glasgefäße

1. Der AutoAnalyzer<sup>4)</sup> wird in Verbindung mit einem Turner Fluorometer Modell 111 mit Durchflußküvettentür<sup>5)</sup> benutzt. Für den Anschluß des Bristol-Zweikanalschreibers ist ein besonderer Adapter<sup>6)</sup> erforderlich. Als Lichtquelle des Fluorometers wird eine Quecksilberlampe (110—850)<sup>5)</sup> benutzt. Das Primärfilter ist ein Bandfilter (110—813)<sup>5)</sup> mit einem Durchlaßmaximum bei 436 nm und das Sekundärfilter (110—826)<sup>5)</sup> ein Kantenfilter mit einer Kante bei 520 nm.
2. Autotitrator Typ TTT 1c in Verbindung mit der Autobürette ABU 1<sup>6)</sup> und den Elektroden G 202 C und K 401, sowie GK 2321 C<sup>6)</sup>.
3. Chromatographieröhre 30 cm lang, 1 cm Durchmesser, vor dem Ablauf eine eingeschmolzene G-2-Fritte, Teflonküken.

##### Reagenzien

Wenn nicht anders vermerkt, werden p. a. Reagenzien der Firma Merck, Darmstadt, benutzt.

##### Abtrennung

1. Aluminiumoxid Woelm neutral<sup>7)</sup> (nach Vorschrift von CROUT (3) behandelt).
2. 0,2M Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA).
3. NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (je 80 g/l).
4. 0,2M Essigsäure.

<sup>3)</sup> Teile dieser Arbeit wurden auf der Tagung Biochemische Analytik vorgetragen (20).

<sup>4)</sup> Hersteller: Technicon Instruments Corpor. Chauncey, USA. Deutsche Vertretung: Technicon GmbH, Frankfurt/Main.

<sup>5)</sup> Hersteller: G. K. Turner Assoc., Palo Alto, USA. Vertretung: Camag, Muttenz, Schweiz.

<sup>6)</sup> Hersteller: Radiometer, Kopenhagen, Dänemark. Deutsche Vertretung: K. Hillerkus, Krefeld.

<sup>7)</sup> M. Woelm, Eschwege.

#### Adrenalinbestimmung

5. 2N Ameisensäure.
6. Natriumformiatpuffer pH 2,8 (0,2N NaOH und 0,2N Ameisensäure 1/7 (v/v)).
7. 0,5proz. Kaliumhexacyanoferrat-[III]-Lösung (5 g in 1 Liter Lösung 6).
8. 0,2proz. Kupferacetatmonohydrat-Lösung (2 g in 1 Liter Lösung 6).
9. 2,0proz. wäBr. 2-Mercaptoäthanol-Lösung<sup>8)</sup> (v/v).
10. 10N NaOH.

#### Noradrenalinbestimmung

11. 2N KOH.
12. 0,2M Kaliumacetatpuffer pH 6,0 (19,6 g Kaliumacetat/l, mit Eisessig auf pH 6,0 einstellen).
13. 0,5proz. Kaliumhexacyanoferrat-[III]-Lösung (5 g in 1 Liter Lösung 12).
14. 5N NaOH (Reduktionsmittel s. Adrenalinbestimmung).

#### Gesamtkatecholaminbestimmung

gleiche Reagenzien wie bei der Noradrenalinbestimmung.

15. 0,5proz. Ascorbinsäurelösung (als Reduktionsmittel).

#### Standards

16. Stammlösung Adrenalin: 18,2 mg Adrenalin-hydrogentartrat<sup>9)</sup> in 10 ml/0,1N HCl.
17. Stammlösung Noradrenalin: 19,9 mg Noradrenalin-hydrogentartratmonohydrat<sup>9)</sup> in 10 ml/0,1N HCl.
18. Arbeitslösungen: Verdünnungen der Stammlösungen mit demin. Wasser 1:100.

#### Arbeitsweise

##### Abtrennung

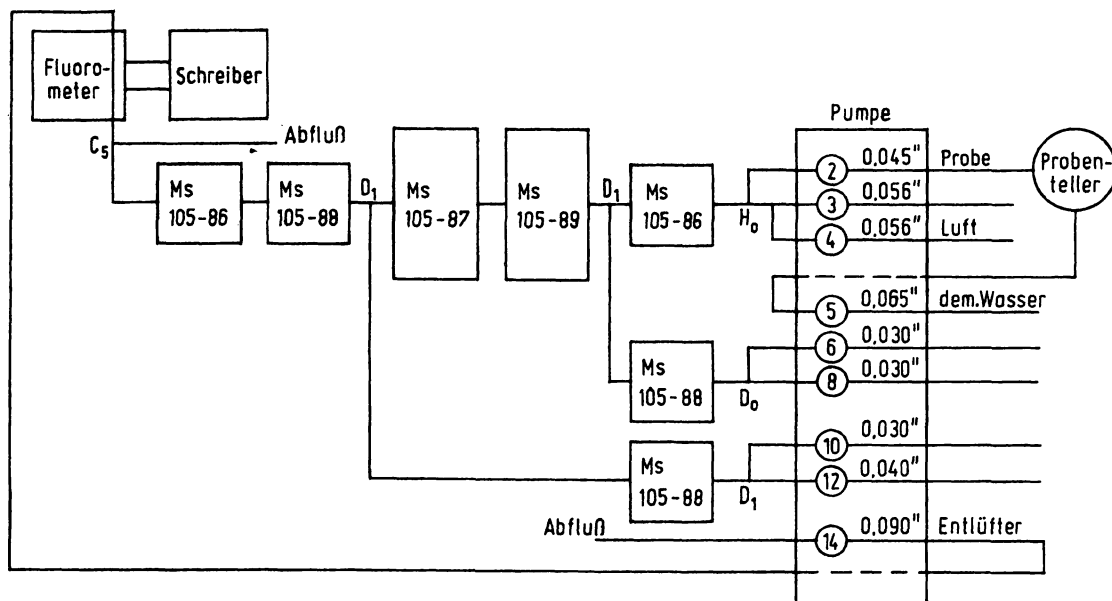
Zur Analyse werden 5 Prozent des 24-Stdn-Urins eingesetzt. Die Probe wird zentrifugiert und die entsprechende Menge in ein 200 ml Titriergefäß der Aurobürette einpipettiert. Anschließend werden 5 ml/0,2M EDTA-Lösung und 3 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mit einem Meßlöffel zugegeben. Mit Lösung 3 wird die Probe am Autotitrator auf pH 8,5 eingestellt. Nach Einstellung des pH-Wertes wird die Probe zur Vervollständigung der Adsorption noch 10 Min. mechanisch gerührt. Es wurde eine Vorrichtung gebaut, mit der drei Proben gleichzeitig gerührt werden können. Nach dem Rühren läßt man die Probe 3—5 Min. stehen, bis das Aluminiumoxid sich abgesetzt hat. Der Überstand wird dann mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgezogen. Der Rückstand wird mit etwas demin. Wasser aufgenommen und möglichst quantitativ in eine Chromatographiesäule überführt. Das Aluminiumoxid wird mit 30 ml demin. Wasser nachgewaschen. Dann werden 3 ml/0,2M Essigsäure auf die Säule gegeben. Dieses Eluat wird verworfen. Die Elution der Katecholamine wird mit 8 ml/0,2M Essigsäure durchgeführt. Das Eluat wird in einem auf 10 ml/Einguß geeichten Zentrifugenglas gesammelt. Die Eluate werden mit demin. Wasser auf 10 ml aufgefüllt und zentrifugiert. In jeweils neue Gefäße werden 4 ml für die Adrenalinbestimmung und 4 ml für die Noradrenalinbestimmung pipettiert. Anschließend werden sie am Autotitrator mit 2N KOH auf pH 6,0 bzw. mit 2N Ameisensäure auf pH 2,8 eingestellt. Die Proben für die Adrenalinbestimmung werden mit Natriumformiatpuffer pH 2,8 und die Proben für die Noradrenalinbestimmung mit Kaliumacetatpuffer pH 6,0 auf 5 ml aufgefüllt. Bei der Bestimmung für die Normalwerte wurde aus dem gleichen Eluat noch die Gesamtkatecholamine und das Dopamin bestimmt.

##### Bestimmung

Das Fließschema des AutoAnalyzers für die fluorometrische Bestimmung des Adrenalins ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Die

<sup>8)</sup> Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

<sup>9)</sup> Fluka AG, Buchs (Schweiz).



Bestandteil	3	6	Lösungen in den Positionen	10	12
Adrenalin	Puffer (6)	0,2proz. Kupferacetatlösung (8)	0,5proz. Kaliumhexacyanoferrat-(III)-Lösung (7)	2proz. 2-Mercapto-äthanollösung (9)	10N NaOH (10)
Noradrenalin	Puffer (12)	Puffer (12)	0,5proz. Kaliumhexacyanoferrat-(III)-Lösung (7)	2proz. 2-Mercapto-äthanollösung (9)	5N NaOH (14)
Gesamtkatecholamine	Puffer (12)	Puffer (12)	0,5proz. Kaliumhexacyanoferrat-(III)-Lösung (7)	0,5proz. Ascorbinsäurelösung (15)	5N NaOH (14)

Abb. 1

Fließschema des AutoAnalyzers für die Adrenalin-, Noradrenalin- und Gesamtkatecholaminbestimmung. Die Zifferangaben sind die Innendurchmesser der Pumpenschläuche in inch. Die eingekreisten Zahlen geben ihre Position auf der Pumpe an. H<sub>0</sub>, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub> und C<sub>5</sub> sind die Bezeichnungen des Herstellers für die Fittings. MS bedeutet Mischspirale. Die dazugehörigen Ziffern sind die entsprechenden Katalognummern. Die Lösungen, die über die Positionen 3, 6, 8, 10 und 12 zugeführt werden, sind für die jeweilige Bestimmung tabellarisch zusammengefaßt. Die in Klammern gesetzten Zahlen bezeichnen die Position der jeweiligen Lösung mit Reagenzienverzeichnis

Anordnung der Mischschlangen ist bei der Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin gleich. Alle Leitungen sind in Glas verlegt. Bei der Noradrenalinbestimmung ergeben sich gegenüber der Adrenalinbestimmung folgende Änderungen. In Position 3 und 8 (Abb. 1) wird anstatt des Natriumformiatpuffers bzw. der Kupferacetatlösung 0,2M Kaliumacetatpuffer pH 6,0 zugeführt. Außerdem wird die 10N NaOH durch 5N NaOH ersetzt. Bei der Gesamtkatecholaminbestimmung werden mit einer einzigen Ausnahme die gleichen Reagenzien benutzt, wie bei der Noradrenalinbestimmung. Anstelle der 2proz. 2-Mercaptoäthanollösung wird 0,5proz. Ascorbinsäurelösung als Reduktionsmittel zugesetzt. Die Analysengeschwindigkeit beträgt 40 oder 60 Proben pro Stunde. Allerdings befindet sich zwischen zwei Proben ein Gefäß mit demin. Wasser. Die resultierende Fluoreszenz wird über einen Schreiber registriert. Die quantitative Auswertung erfolgt über die Peakhöhen. Erwähnt sei, daß auch ein Fließschema ohne Verdünnung der Probe mit Puffer benutzt wurde. Gegenüber dem in Abbildung 1 gezeigten Fließschema ergeben sich dann folgende Änderungen. Der Probenschlauch (0,045 inch) wird durch einen Schlauch mit einem Innendurchmesser von 0,073 inch ersetzt. Allerdings ist dann der Einbau eines Entlüftungsfitings erforderlich. Es entfällt die Spirale zur Mischung von Probe und Puffer.

Zur Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgt über drei externe Standards. Bei jeder Versuchsreihe werden zwischen 30 und 200 µl Arbeitslösung (je nach der erforderlichen Spaltbreite des Fluorometers) zu 9 ml 0,2M Essigsäure pipettiert und mit demin. Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Diese Standardlösungen werden dann wie die Proben nach der Elution weiterbehandelt. Bei der Adrenalinbestimmung wird ein Noradrenalinstandard mitgeführt, um den

Noradrenalineinfluß bei der Adrenalinbestimmung berücksichtigen zu können.

Die Leerwerte werden so ermittelt, daß nach Ersatz der 2-Mercaptoäthanollösung durch demin. Wasser die Fluoreszenz erneut gemessen wird.

#### Berechnung:

$$\mu\text{g NA/Eluat} = \frac{c_{\text{ST}}(P_{\text{P}} - P_{\text{L}})}{P_{\text{ST/NA}}}$$

$$\mu\text{g A/Eluat} = \frac{(P_{\text{P}} - P_{\text{L}}) - \mu\text{g NA/Eluat} \times K_1}{K_2}$$

P<sub>P</sub> = Peakhöhe der Probe

P<sub>L</sub> = Peakhöhe des Leerwertes

P<sub>ST</sub> = Peakhöhe des Standards

c<sub>ST</sub> = Konzentration des Standards  
µg/10 ml

NA = Noradrenalin

A = Adrenalin

$$K_1 = \frac{P_{\text{ST/NA}}}{c_{\text{ST/NA}}}$$

$$K_2 = \frac{P_{\text{ST/A}}}{c_{\text{ST/A}}}$$

#### Radiochemische Messungen

Ein Teil der Versuche zur Überprüfung des Abtrennverfahrens wurde radiochemisch durchgeführt. Zur Bestimmung der Aktivität von <sup>14</sup>C-markiertem Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin<sup>10)</sup>

<sup>10)</sup> Hersteller: NEN Corp. Boston, USA. Deutsche Vertretung: NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain, Frankfurt/Main.

wurde das Liquid-Szintillation-Spektrometer Modell 3375<sup>11)</sup> benutzt. Die Reinheit der genannten Verbindungen wurde dünn-schichtchromatographisch geprüft. In der benutzten Meßanordnung ergaben 0,02 µg Adrenalin, 0,02 µg Noradrenalin und 0,4 µg Dopamin etwa  $2 \cdot 10^4$  Imp./Min. Der Nulleffekt lag bei 20–30 Imp./Min. Zur Messung wurden 1–3 ml/ der essigsäuren Eluate nach Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Chromatographie mit Szintillationsflüssigkeit nach HAYES<sup>12)</sup> auf 20 ml/ aufgefüllt und die Aktivität bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach der Methode des inneren Standards.

### Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Dieser methodische Teil ist kurz gefaßt, da die Daten teilweise schon in vorhergehenden Arbeiten publiziert wurden (19, 20).

#### Präzision

Die Analysen der Proben des Normalkollektivs wurden unter statistischer Qualitätskontrolle durchgeführt. Dazu wurden bei jeder Serie Doppelbestimmungen mit selbst hergestellten Kontrollurinproben durchgeführt. Aus der Differenz der Doppelbestimmungen wurde die Streuung in der Serie und aus dem ersten Wert der

<sup>11)</sup> Hersteller: Packard Instrument Corp., Inc. Downers Grove, USA. Deutsche Vertretung: Packard Instruments GmbH, Frankfurt/Main.

<sup>12)</sup> Packard Technical Bulletin, Nr. 1 April (1963).

Doppelbestimmungen die Streuung von Tag zu Tag berechnet. Außerdem wurde zu einem späteren Zeitpunkt aus Neunfachbestimmungen derselben Kontrollprobe die Streuung in einer Serie berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Der Variationskoeffizient für die Streuung in der Serie aus n-fach-Bestimmungen ist bei allen Bestandteilen am kleinsten, während er für die Streuung von Tag zu Tag am größten ist. Die bei der Ermittlung der Streuung in der Serie aus den Neunfachbestimmungen gewonnenen arithmetischen Mittelwerte liegen fast alle niedriger als die aus den Doppelbestimmungen ermittelten Werte, aber noch innerhalb der 3s-Grenze.

#### Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate wurde durch Aufstockungsversuche unterschiedlicher Größe an Poolurinproben bestimmt. Die für die Fluorometrie angegebenen Werte sind die Spannweiten der ermittelten Wiederfindungen für unterschiedliche Aufstockzusätze aus verschiedenen Versuchsreihen im Laufe eines Jahres (letzte Spalte Tabelle 2). Die radiochemisch ermittelten Ausbeuten sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen (vorletzte Spalte Tabelle 2).

Tab. 1  
Ergebnis der Präzisionskontrolle mit selbst hergestellten Kontrollurinproben

Bestandteil	statistische Kenngröße	in der Serie aus n-fach-Bestimmungen	in der Serie aus Doppelbestimmungen	von Tag zu Tag
Adrenalin	$\bar{x}$ (µg/l)	7,8	8,9	8,8
	s (µg/l)	0,3	0,6	0,7
	V (%)	4,5	6,3	7,8
	n	Neunfachbestimmungen	18 Doppelbestimmungen	20 Einfachbestimmungen
Noradrenalin	$\bar{x}$ (µg/l)	38	49	50
	s (µg/l)	1,5	3	6
	V (%)	3,9	6,7	12,3
	n	Neunfachbestimmungen	18 Doppelbestimmungen	20 Einfachbestimmungen
Gesamtkatecholamine	$\bar{x}$ (µg/l)	67	73	73
	s (µg/l)	1,4	2	5
	V (%)	2,1	2,2	7,1
	n	Neunfachbestimmungen	19 Doppelbestimmungen	21 Einfachbestimmungen
Dopamin	$\bar{x}$ (µg/l)	290	281	281
	s (µg/l)	8	13	19
	V (%)	2,9	4,5	6,9
	n	Neunfachbestimmungen	19 Doppelbestimmungen	21 Einfachbestimmungen

Tab. 2  
Ergebnis von Wiederfindungsversuchen an Poolurinproben

Bestandteil	statistische Kenngröße	nicht aufgestockt	aufgestockt	Aufstockzusatz (µg)	Ausbeute %	Ausbeute % radiochemisch	Ausbeute % fluorometrisch
Adrenalin	$\bar{x}$ (µg/40 ml)	0,30	0,54	0,3 Adrenalin	80	83	78–90
	s (µg/40 ml)	0,005	0,016		5		
	V (%)	1,8	2,9		5		
	n	5	5		5		
Noradrenalin	$\bar{x}$ (µg/40 ml)	2,14	3,82	2,0 Noradrenalin	84	84	79–88
	s (µg/40 ml)	0,08	0,06		3		
	V (%)	3,8	1,6		5		
	n	5	5		5		
Gesamtkatecholamine	$\bar{x}$ (µg/40 ml)	2,89	4,32	2,0 Noradrenalin	71	84	72–80
	s (µg/40 ml)	0,11	0,02		1		
	V (%)	3,8	0,5		5		
	n	5	5		5		
Dopamin	$\bar{x}$ (µg/40 ml)	7,6	13,0	6,0 Dopamin	90	86	75–90
	s (µg/40 ml)	0,44	0,44		2		
	V (%)	5,9	3,4		5		
	n	5	5		5		

Diese Wiederfindungen stimmen mit den Literaturangaben überein (3, 21). Die Präzision der Wiederfindungsversuche wurde aus Fünffachbestimmungen in einer Serie bestimmt (Tabelle 2). Dabei waren die Aufstockzusätze so gewählt, daß sie dem Gehalt der nicht aufgestockten Probe entsprachen. Eine mögliche Zunahme der Streuung mit höherer Konzentration kann aus diesen Werten nicht abgeleitet werden.

#### Nachweisgrenze

Die aus Mittelwert plus Standardabweichung ( $\bar{x} + 3s$ ) der Leerwerte bestimmte Nachweisgrenze (22) liegt beim Adrenalin bei 0,5 µg/l, beim Noradrenalin bei 3 µg/l und beim Dopamin bei 10 µg/l (19, 20).

#### Störeinflüsse

Die Dopaminbestimmung wird selbst durch hohe Adrenalin- und Noradrenalinmengen nicht gestört (19). Dagegen wurde eine mehr oder minder starke wechselseitige Beeinflussung von Adrenalin und Noradrenalin und eine Störung durch Dopamin bei ihrer Bestimmung beobachtet. Der Störeinfluß durch Medikamente wurde an anderer Stelle besprochen (20).

Die Fluoreszenz des Noradrenalins beträgt etwa 5 Prozent der des Adrenalins bei gleicher Konzentration und Oxydation bei pH 2,8 (1, 2, 20). Bei gesunden Probanden beträgt die Adrenalinausscheidung etwa 10 bis 20 Prozent der des Noradrenalins, so daß die Adrenalinwerte ohne Berücksichtigung der Störeinflüsse zu hoch bestimmt werden. Die Fluoreszenz einer gleich konzentrierten Dopaminlösung beträgt etwa 1 Prozent der des Noradrenalins nach Oxydation bei pH 6,0. Bei der Bestimmung der Normalwerte wurden in dem gleichen Eluat Dopamin und Noradrenalin bestimmt, so daß eine Korrektur der Noradrenalinwerte über einen mitgeführten Dopaminstandard möglich war. Die nicht korrigierten Werte liegen  $8 \pm 3\%$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 98$ ) höher als die korrigierten. Diese Korrektur wurde bei der Angabe des Normbereiches der Noradrenalinausscheidung aus methodischen Gründen nur in Klammern angegeben. Der zur Korrektur benutzte Dopaminstandard mußte nämlich fünffach höher konzentriert als bei der Dopaminbestimmung gewählt werden, um eine sicher meßbare Peakhöhe (Fluoreszenz) zu erhalten.

#### Probeverwahrung

Führt eine Person die Bestimmung der Katecholamine durch, so ist es rationeller, an einem Tag bei einer größeren Anzahl von Proben die Abtrennung und am nächsten Tag die Bestimmung vorzunehmen. Voraussetzung ist, daß in den Säuleneluaten keine Zerstörung der zu bestimmenden Substanz eintritt. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde folgender Versuch durchgeführt. Die Eluate von sechs verschiedenen Urinproben wurden aliquotiert. Ein Teil wurde am gleichen Tag analysiert (Tab 3, A), der restliche Teil bis zur Bestimmung nach etwa 24 Std bei  $+4^\circ$  im Eisschrank aufbewahrt (Tab. 3, B). Die elektrometrisch bestimmten pH-Werte der Eluate lagen zwischen 3,2 und 3,4.

Tab. 3

Versuche zur Probeverwahrung mit 6 verschiedenen Poolurinproben. A = Eluate am gleichen Tag analysiert, B = Eluate nach 24stündiger Aufbewahrung bei  $+4^\circ$  im Eisschrank analysiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen

Probe	Adrenalin µg/50 ml		Noradrenalin µg/50 ml		Dopamin µg/50 ml	
	A	B	A	B	A	B
1	0,23	0,18	1,40	1,53	13,4	12,6
2	0,54	0,54	2,29	2,19	4,4	3,1
3	0,10	0,12	2,93	2,96	12,4	10,9
4	0,24	0,23	2,96	3,08	7,4	7,7
5	0,89	0,68	1,54	1,46	9,9	10,3
6	0,33	0,35	2,73	3,00	4,6	5,1

Nach diesen Versuchen (Tabelle 3) ist eine verlustfreie Verwahrung der Säuleneluats für alle drei Bestandteile unter den angegebenen Versuchsbedingungen möglich. Die Differenzen der sich jeweils entsprechenden Meßwerte liegen im Bereich der methodischen Streuung. Das Ergebnis der Probeverwahrung stimmt mit den Literaturangaben überein (17, 23).

#### Prüfung der Methode

##### Bestimmungsverfahren

Für den untersuchten Konzentrationsbereich von 2 ng bis 1 µg Adrenalin/ml Probe und 5 ng bis 1 µg Noradrenalin/ml Probe wurde eine lineare Abhängigkeit von Fluoreszenz und Konzentration gefunden.

Die Konzentrationen der einzelnen in der Arbeitsvorschrift angegebenen Reagenzien, die Einwirkungszeit des Oxydationsmittels und der alkalischen 2-Mercaptoäthanollösung wurden variiert. Diejenige Versuchsanordnung wurde als optimal angesehen, die die größte Fluoreszenz ergab. Das Ergebnis der Variation der Kupferionenkonzentration zeigte einige neue Gesichtspunkte, so daß darüber ausführlich berichtet werden soll.

Nach WEIL-MALHERBE beruht die Wirkung der Kupferionen auf einem katalytischen Effekt bei der Oxydation. Dies könnte aber nur eine Verkürzung der Oxydationszeit bedingen. Gegen einen katalytischen Effekt sprechen die Ergebnisse von HÄGGENDAHL (10), daß nämlich die Fluoreszenzabnahme in alkalischer Lösung durch Kupferionen innerhalb eines gewissen Zeitabschnittes mit EDTA partiell aufgehoben werden kann. Dieser Versuch zeigt, daß eine Reaktion zwischen Fluorophor und Kupferionen stattfindet. Diese Annahme wird gestützt durch die Zunahme der Stabilität des Fluorophors bei Zugabe von Kupferionen (Abbildung 2). Die Fluoreszenzminderung bei Zugabe von Kupferionen nach der Oxydation zusammen mit der alkalischen 2-Mercaptoäthanollösung — eine Beobachtung (1, 2), die bestätigt werden kann — ist nicht beweisend für eine alleinige Wirkung des Kupfers bei der Oxydation. Dieser Effekt könnte darauf beruhen, daß die Kupferionen mit den SH-Gruppen des Reduktionsmittels reagieren und somit nicht mehr für eine Reaktion mit dem Fluorophor zur Verfügung stehen. Nimmt man nämlich statt des

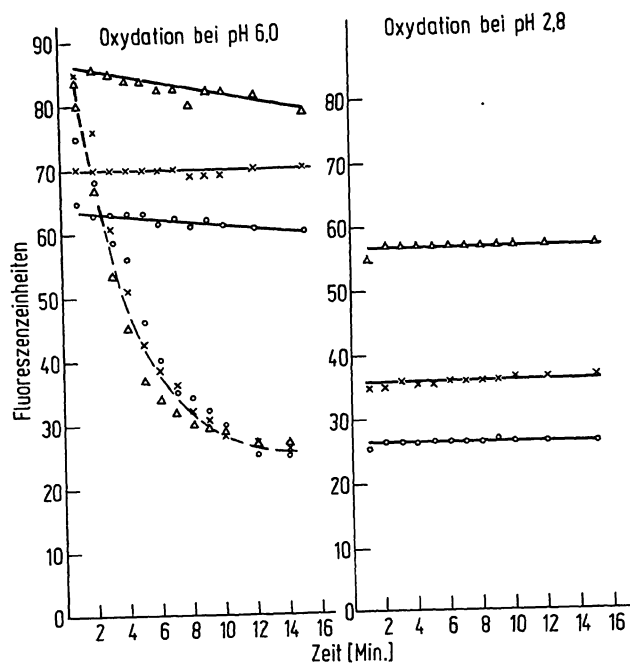


Abb. 2

Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit von drei verschiedenen Urinproben (ohne Kupferionenzusatz gestrichelte Linie)

SH-haltigen Reduktionsmittels Ascorbinsäure (Oxydation bei pH 6,0), so tritt dieser Effekt nicht ein. Dieses unterschiedliche Verhalten bei Verwendung von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel ist schon bei HÄGGENDAHL (10) beschrieben worden.

Bei Untersuchungen über die Stabilität des Fluorophors wurden neben reinen Adrenalin- und Noradrenalinlösungen auch drei verschiedene Urinproben unterschiedlicher Adrenalin- und etwa gleicher Noradrenalin-konzentration untersucht. Das Ergebnis der Messung der Urinproben ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Die Messungen wurden manuell durchgeführt. Die Volumina und Reaktionszeiten wurden analog der automatischen Bestimmung gewählt.

Für die Oxydation bei pH 6,0 wurden die Messungen mit und ohne Kupferacetatzusatz (0,01proz. Lösung) und für die Oxydation bei pH 2,8 nur mit Kupferionen — in beiden Versuchsanordnungen ohne Ansäuern nach Thiolatzugabe — durchgeführt. Für die Oxydation bei pH 2,8 liegen die Meßpunkte einer Probe praktisch auf

einer Geraden. Der Fluorophor ist für den untersuchten Zeitraum stabil. Hinsichtlich der Adrenalin-konzentration sind die Proben unterschiedlich. Für die Messung bei pH 6,0 lassen sich zwei Effekte erkennen. Einmal bewirkt der Zusatz der Kupferionen (durchgezogene Linie) eine Stabilisierung des Fluorophors. Zum anderen liegen die Meßpunkte für die drei verschiedenen Urinproben ohne Kupferionenzusatz eng beieinander (aus Übersichtsgründen nur eine gestrichelte Linie), während sie mit Kupferionen (durchgezogene Linie) voneinander getrennt liegen. Eine Erklärung für diesen Befund ergeben Versuche, die in Abbildung 3 zusammengefaßt sind. Hierbei wurde die Fluoreszenz gleicher Adrenalin- und Noradrenalin-konzentrationen bei pH 2,8 und 6,0 mit unterschiedlicher Kupferionen-konzentration bestimmt.

Die Variation dieses Parameters bei der Oxydation bei pH 2,8 — allerdings hier nur in einem engen Konzentrationsbereich gemessen — zeigt einen geringen Einfluß auf die Fluoreszenz von Adrenalin und Noradrenalin. Ganz deutlich ist die Fluoreszenzzunahme des Adrenalins bei Zugabe der Kupferionen. Oxydiert man die Probe bei pH 6,0, so nimmt die Fluoreszenz des Noradrenalins mit steigender Kupferionen-konzentration zunächst etwas zu, dann wiederum ab, während die des Adrenalins kontinuierlich zunimmt. Nicht angeführt ist das Verhalten von Dopamin, dessen Fluoreszenz über den gemessenen Konzentrationsbereich praktisch unverändert niedrig blieb. Die in Abbildung 2 beobachteten Unterschiede der Fluoreszenz (Oxydation pH 6,0, mit Kupferionen) dürfen somit durch die Zunahme der Fluoreszenz von Adrenalin, dessen Konzentration in den drei Proben unterschiedlich ist, bedingt sein. Das unterschiedliche Verhalten von Adrenalin und Noradrenalin nach Oxydation bei pH 6,0 und steigender Kupferionen-konzentration bietet vielleicht eine Möglichkeit einer differentiellen Adrenalin- und Noradrenalinbestimmung, indem man die Proben ohne und mit Kupferionenzusatz bei einem schwach sauren pH oxydiert. Durch Variation des pH-Wertes um 6,0 und der Kupferionen-konzentration läßt sich möglicherweise eine Versuchsanordnung mit hoher Fluoreszenzausbeute für das Adrenalin und einer niedrigen für das Noradrenalin finden. Dieses Verfahren hätte den Vorzug, daß die Säuleneluate nicht

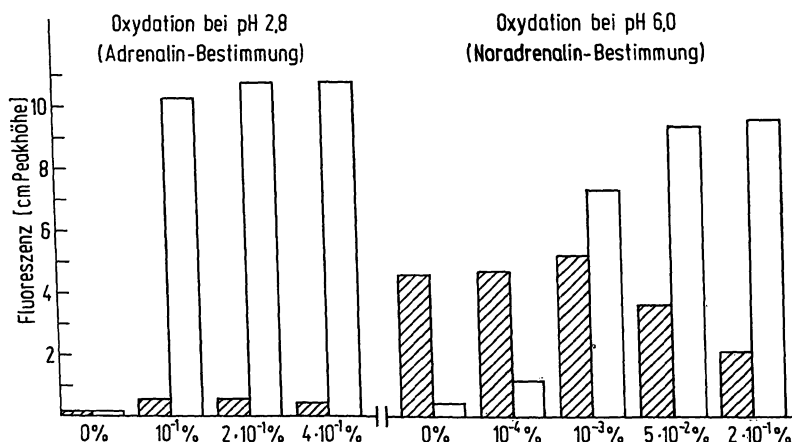


Abb. 3

Verhältnis der Fluoreszenz von Adrenalin (nicht schraffiert) und Noradrenalin (schraffiert) für unterschiedliche Kupferionen-konzentration und Oxydation bei pH 2,8 und 6,0. Auf der Abszisse sind die benutzten Kupferacetatmonohydratkonzentrationen in g/100 ml angegeben

aliquotiert und auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt werden müßten.

Anlaß für das Einbeziehen von Noradrenalin in diese Untersuchung waren die Angaben, daß Kupferionen in bestimmter Konzentration in alkalischer Lösung zu einer Fluoreszenzminderung führen (10), in schwach saurer oder neutraler Lösung die Fluoreszenz unbeeinflusst bleibt (10, 2). VALORI beobachtete eine Fluoreszenzsteigerung (18). Wie die Abbildung zeigt, ist die Fluoreszenz von Adrenalin und Noradrenalin in alkalischer Lösung von der Kupferionenkonzentration abhängig, wobei die optimalen Konzentrationen für Adrenalin (pH 2,8) und Noradrenalin (pH 6,0) sich erheblich unterscheiden. Diese Konzentrationsabhängigkeit zeigt auch, daß eine Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz je nach Kupferionenkonzentration beobachtet werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Ergebnisse der eigenen Versuche über den Einfluß der Kupferionen auf die Stabilität des Fluorophors sowie die Fluoreszenzintensität ebenfalls gegen einen einfachen katalytischen Effekt bei der Oxydation sprechen. Insbesondere die Stabilitätszunahme zeigt, daß eine Reaktion zwischen dem Fluorophor und den Kupferionen stattfindet. Allerdings sei eingeräumt, daß auch nach diesen Versuchen noch keine eindeutige Aussage über den Reaktionsablauf gemacht werden kann. Ein Ansäuern der Probe nach Thiolatzugabe (1, 2) zur Stabilisierung des Fluorophors ist bei Anwesenheit von Kupferionen nicht erforderlich. Allerdings ist bei der Noradrenalinbestimmung zu berücksichtigen, daß je nach Kupferionenkonzentration die Fluoreszenzintensität des Adrenalins erheblich zunehmen kann, so daß sein Störeinfluß auf die Noradrenalinbestimmung nicht mehr vernachlässigt werden darf. Von Bedeutung ist diese Stabilisierung des Fluorophors allerdings nur bei manueller Durchführung der Bestimmung.

#### Abtrennverfahren

Zur Abtrennung der Katecholamine aus dem Urin sind verschiedene Verfahren beschrieben worden. Neben der Verwendung von Ionenaustauschern hat die Adsorption an Aluminiumoxid bei pH 8,3–8,5 breite Anwendung gefunden. Führt man die Elution in zwei Schritten durch, so erhält man zwei Fraktionen der Katecholamine und ihrer Metabolite. Bei Elution mit 0,2M Essigsäure werden zunächst die Katecholamine und ein kleiner Anteil der Katecholsäuren desorbiert. Gibt man anschließend 1N Schwefelsäure in die Säule, wird der Hauptteil der Katecholsäuren eluiert (24). Die erste Fraktion enthält Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Dopa. Unter physiologischen Verhältnissen ist Dopa im Urin in nicht nachweisbaren Mengen vorhanden (3). Die hohe Umsatzgeschwindigkeit von Dopa bedingt, daß es sich dem Nachweis entzieht (25).

Bei erhöhten Dopaminausscheidungen sollte man die von BERTLER und Mitarbeiter (5) vorgeschlagene Dopa-Dopamin-Trennung über einen Ionenaustauscher durch-

führen. Die in Tabelle 7 angegebenen Dopaminwerte wurden ohne diese Trennung ermittelt.

Die Adsorption an Aluminiumoxid wird mit verschiedenen Techniken durchgeführt. Dabei kommen zur Anwendung Säulen- und batch-Technik (1, 21), sowie eine Kombination der beiden Verfahren (3). Verwendet man an Stelle des von CROUT (3) empfohlenen Magnetrührers bei der Adsorption einen mechanischen Rührer, dann entfällt der Einwand (24), daß bei diesem Vorgehen beim Einstellen des pH-Wertes und dem nachfolgenden Rühren das Aluminiumoxid zerkleinert wird und durch die Säule läuft. Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen wurde der Einfluß folgender Parameter auf die Wiederauffindung geprüft, die pH-Abhängigkeit der Adsorption, der Einfluß der Rührzeit nach Einstellen des pH-Wertes, die Menge des eingesetzten Aluminiumoxides und die unterschiedliche Abtrenntechnik.

#### Abhängigkeit und Einfluß der Rührzeit auf die Adsorption

Das pH-Optimum für die Adsorption der Katecholamine an Aluminiumoxid liegt nach den Ergebnissen der meisten Untersucher bei pH 8,3–8,5. Nach CHANG (26) soll die Adsorption der Katecholamine schon bei pH 7,0 vollständig sein. CROUT (3) empfiehlt bei seiner Abtrenntechnik die Probe nach Einstellen des pH-Wertes auf pH 8,3–8,5 zur Vervollständigung der Adsorption noch 7 Min. zu rühren. Der Einfluß der beiden Parameter wurde nachuntersucht (Tabelle 4).

Tab. 4

Einfluß des pH-Wertes der Urinproben bei 10minütigem Rühren nach Erreichen des pH-Wertes und der Rührzeit nach Einstellen der Proben auf pH 8,5 auf die Adsorption der Katecholamine an Aluminiumoxid. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

A = fluorometrische Bestimmung,  
B = radiochemische Bestimmung.

A = Adrenalin, NA = Noradrenalin, DM = Dopamin

pH		Ausbeute %		Rührzeit (Min.)		Ausbeute %	
		A	B			A	B
8,5	A	100	100	0	A	89	92
	NA	100	100		NA	93	89
	DM	100	100		DM	95	97
7,0	A	39	56	5	A	104	99
	NA	37	54		NA	94	102
	DM	34	54		DM	95	100
6,0	A	4	2	10	A	100	100
	NA	3	2		NA	100	100
	DM	3	6		DM	100	100

Dazu wurden Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin in 40 ml/ Poolurin bei verschiedenem pH-Wert und konstanter Rührzeit von 10 Min. bzw. bei unterschiedlicher Rührzeit und konstantem pH-Wert von 8,5 bei der Adsorption fluorometrisch bestimmt (Tab. 4, A). Die fluorometrischen Werte wurden durch radiochemische Bestimmung der Wiederauffindung überprüft (Tab. 4, B). Die Werte für die Versuchsbedingung, die die höchsten Ausbeuten ergab, also die Adsorption bei pH 8,5 und 10 Min. Rührzeit, wurden 100 Prozent gesetzt und die übrigen Werte in Prozent dieser Werte umgerechnet. Die Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses der Rührzeit sind eine Bestätigung für das von CROUT (3) empfohlene Vor-



gehen. Die pH-Abhängigkeit stimmt mit den Angaben der meisten Untersucher überein, nicht aber mit denen von CHANG (26).

#### *Einfluß der Menge an Aluminiumoxid und der Abtrenntechnik auf die Adsorption*

Wie in der Arbeitsvorschrift angegeben, wird die zur Analyse eingesetzte Urinmenge nach Zusatz von Aluminiumoxid mit demin. Wasser auf etwa 180 ml aufgefüllt. Anschließend wird der pH-Wert eingestellt. Für unterschiedliche Mengen an Aluminiumoxid wurden die Wiederfindungsraten für Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin bestimmt (Tabelle 5). Die in Klammern angegebenen Werte wurden fluorometrisch ermittelt. Außerdem wurde die Wiederfindung mit der Säulentechnik bestimmt.

Tab. 5

Wiederfindung in Abhängigkeit von der eingesetzten Aluminiumoxidge-  
menge und der Technik des Abtrennverfahrens. Die angegebenen  
Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen

Substanz	Adsorption nach CROUT (Ausbeute %)			Chromato- graphie (Ausbeute %)
	1 g Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2 g Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3 g Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	
Adrenalin	74	81	82 (86)	77 (78)
Noradrenalin	75	84	84 (94)	79 (84)
Dopamin	73	82	85	78

Für die benutzte Art der Abtrennung besteht zwischen 2 g und 3 g Aluminiumoxid kein Unterschied in den Wiederfindungsraten. Bei Verwendung von 1 g liegen die Ausbeuten niedriger. Die Wiederfindung mit der Säulentechnik, die mit den gleichen Volumina wie die kombinierte Abtrenntechnik durchgeführt wurde, ist bei Verwendung gleicher Aluminiumoxidge-mengen niedriger als mit der Technik von CROUT. Dies ist nicht als Beweis für die Überlegenheit der letzteren über die Säulentechnik anzusehen; denn es ist durchaus möglich, daß bei Variation der Volumina und der Aluminiumoxidge-menge mit der Säulentechnik die gleichen Ausbeuten erreicht werden. Andererseits besteht aber kein Grund zu der Annahme, daß zwischen beiden Verfahren grundsätzliche Unterschiede bestehen.

#### *Vorbehandlung des Aluminiumoxids*

Von verschiedenen Autoren wird vorgeschlagen, das Aluminiumoxid vor Benutzung mit Säure zu waschen, um Spuren von Schwermetallen, Alkali und ganz feine Partikel zu entfernen (2, 3). Der Einfluß der Vorbehandlung wurde an reinen Lösungen und Poolurinproben geprüft, indem nicht vorbehandeltes, mit demin. Wasser und mit 2 N Salzsäure vorbehandeltes Aluminiumoxid-Woelm für die Abtrennung der Katecholamine benutzt wurde. Die Vorbehandlung des Aluminiumoxides wurde analog der Vorschrift von CROUT (3) durchgeführt. Die Bestimmung der Ausbeute mit unterschiedlich vorbehandeltem Aluminiumoxid erfolgte radiochemisch und fluorometrisch (Tabelle 6). Nach diesen Messungen besteht also ein eindeutiger Unterschied zwischen unbehandeltem und vorbehand-

Tab. 6

Vergleich der Wiederfindungen mit verschieden vorbehandeltem Aluminiumoxid. Die mit säuregewaschenem Aluminiumoxid ermittelten Werte wurden für jeden Bestandteil gesondert 100 % gesetzt und die Werte der beiden anderen Versuchsreihen in Prozent dieser Werte umgerechnet. Die angegebenen Meßwerte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen

A = fluorometrische, B = radiochemische Bestimmung

Probe	Substanz	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Ausbeute in %)					
		nicht vorbehandelt		vorbehandelt mit Wasser		vorbehandelt mit Säure	
		A	B	A	B	A	B
reine Lösung	Adrenalin	89	88	100	98	100	100
	Noradrenalin	79	89	96	99	100	100
	Dopamin	80	77	99	90	100	100
40 ml Poolurin	Adrenalin	100	90	100	97	100	100
	Noradrenalin	84	95	96	97	100	100
	Dopamin	87	88	90	98	100	100

deltem Aluminiumoxid. Für den ersteren Fall liegen die Ausbeuten eindeutig niedriger. Ob ein wirklicher Unterschied zwischen wasser- und säuregewaschenem Aluminiumoxid besteht, müßte durch eine größere Anzahl von Messungen geprüft werden. Da aber der zusätzliche Arbeitsaufwand für die Vorbehandlung mit Säure gering ist, ist diese Fragestellung ohne praktische Bedeutung. Bei allen Versuchen wurde daher säuregewaschenes Aluminiumoxid benutzt. Für die eigenen Arbeiten wurde die Regelung eingeführt, daß für jede neue Charge Aluminiumoxid die Wiederfindung radiochemisch mit <sup>14</sup>C-markiertem Adrenalin überprüft wird.

#### *Elutionsprofil der adsorbierten Katecholamine*

Bei dem Verfahren von CROUT werden nach dem Waschen der Säule (3 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) mit demin. Wasser 3 ml 0,2 N Essigsäure auf die Säule gegeben. Diese Vorfraktion wird verworfen, die eigentliche Elution anschließend mit 8 ml 0,2 M Essigsäure durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob mit der Vorfraktion nicht schon Katecholamine miteluiert werden und welchen Einfluß das „Vorwaschen“ auf das Elutionsprofil hat. Dies wurde in getrennten Versuchen mit markiertem Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin geprüft.

Es wurden 40 ml Poolurin mit den entsprechenden markierten Verbindungen aufgestockt, Vorfraktion und Eluat in 1 ml Fraktionen gesammelt und deren Aktivität (gestrichelte Linie) bestimmt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Vorelution mit 3 ml 0,2 M Essigsäure weggelassen. Sofort nach dem Waschen mit demin. Wasser wurden 8 ml 0,2 M Essigsäure auf die Säule gegeben (durchgezogene Linie). Beide Versuche wurden mit 2 g und 3 g Aluminiumoxid durchgeführt.

In Abbildung 4 ist das Ergebnis dieser Versuchsreihen am Beispiel des Adrenalins für unterschiedliche Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Mengen wiedergegeben. Die Vorfraktionen sind nicht mit eingezeichnet. Ihre Aktivitäten lagen in der Größenordnung des Nulleffekts. Nimmt man die Vorfraktionen dazu, dann decken sich die beiden Elutionsprofile. Für Noradrenalin und Dopamin liegen die Elutionsmaxima in den gleichen Fraktionen. Ihre Lage ist einmal von der Menge des eingesetzten Aluminiumoxids abhängig und zum anderen von der Vorelution mit Essigsäure. Wie man aus Abbildung 4 ersieht, ist das Elutionsprofil nicht



---



# VERLAG CHEMIE

---

*Hellmut Fiedler*

## Chemisches Rechnen

auf elementarer Grundlage in Form einer Aufgabensammlung

1970. 7. verbesserte Auflage. 368 Seiten mit 28 Abbildungen. Broschiert DM 19,80.

(Lizenzausgabe für die Bundesrepublik Deutschland.)

---

Der Anfänger hat gewöhnlich Mühe mit der Berechnung chemischer Aufgaben, und er gerät in Schwierigkeiten, wenn er den vermeintlich so einfachen Dreisatz oder die Verhältnisleichung auf komplizierte Mischungsprobleme anwenden soll. Auch erfordert es erfahrungsgemäß meist einige Übung, bis mit chemischen Formeln ein sicheres Gefühl für die durch sie symbolisierten Stoffmengen verbunden wird.

Dieses Buch führt mit kurzen Erläuterungen in die verschiedenen Gebiete

des chemischen Rechnens ein: Mischungsvorgänge, Herstellung von Lösungen bestimmter Konzentration, Berechnung der prozentualen Zusammensetzung von Verbindungen, Ermittlung von stöchiometrischen Faktoren, Anwendung des idealen Gasgesetzes, quantitative Analyse; und es gibt anhand von über 400 Aufgaben Gelegenheit, sich die notwendige Beherrschung des Stoffes anzueignen. Die 400 in den Text eingebauten Aufgaben werden mit ausführlichen Lösungsgängen bis zum Endresultat entwickelt und setzen den Leser in

die Lage, die restlichen Aufgaben selbständig zu lösen. Der Vergleich mit den im Anhang zusammengestellten Resultaten bietet eine Kontrolle, ob der erwünschte Lernerfolg eingetreten ist.

Im Anhang finden sich außerdem noch tabellarische Zusammenstellungen von Atom- und Molekularmassen und ihren Logarithmen, Dichtetabellen und eine fünfstellige Logarithmentafel.

---

VERLAG CHEMIE · GMBH  
WEINHEIM/BERGSTR.

---

## Klinisches Labor

1970. 11. Auflage der Medizinisch-chemischen Untersuchungsmethoden. 632 Seiten mit zahlreichen Abbildungen und Tabellen, einer umfangreichen Normalwertetabelle, einem Literaturverzeichnis zur Normalwertetabelle sowie einem Reagenzien- und Sachverzeichnis. Kunststoff-einband DM 20,—

(Eine Veröffentlichung der E. Merck AG., Darmstadt)

### Über dieses Buch:

Die rasche Entwicklung der klinischen Laboratoriumsdiagnostik machte eine gründliche Überarbeitung und umfangreiche Erweiterung dieser Methodensammlung erforderlich. Dem Inhalt der 11. Auflage liegt eine Umfrage der Herausgeber bei klinischen Chemikern und Laboratoriumsärzten zugrunde, um eine möglichst praxisnahe Auswahl moderner Labormethoden zu treffen. Die Bearbeitung der klinisch-chemischen Methoden übernahm Prof. Dr. R. Clotten, Freiburg, die der flammenphotometrischen Serumanalyse Prof. Dr. R. Herrmann, Gießen; das Kapitel über Mikrolitermethoden schrieb Prof. Dr. H. Mattenheimer, Chicago. Bei der Abfassung des Abschnittes über die Prüfung des Kohlenhydratstoffwechsels wirkte Prof. Dr. H. Mehnert, München, maßgeblich mit. Die hämatologischen Methoden wurden von Prof. Dr. W. Hunstein, Göttingen, und Dr. H.-G. Harwerth, Freiburg, bearbeitet.

Da die Arbeiten zur Standardisierung der Labormethoden noch im Gange sind und in verschiedenen Laboratorien teilweise unterschiedliche Methoden gebräuchlich sind, wurden bei wichtigen Bestimmungen und Nachweisen mehrere Techniken dargestellt, um dem Benutzer die Möglichkeit zu geben, das für seine Zwecke am besten geeignete Verfahren zu wählen. Bei Methoden, mit denen keine eigenen Erfahrungen vorlagen, werden Hinweise auf die Originalliteratur gegeben, die der an der Durchführung Interessierte zu Rate ziehen kann. Neu aufgenommen wurde eine ausführliche Normalwertetabelle, deren Daten durch Literaturzitate belegt sind. Nach Möglichkeit ist dort auch die Methodik genannt, mit der die Normalwerte ermittelt worden sind.

Wir übersenden Ihnen gern unseren Sonderprospekt.

VERLAG CHEMIE · GMBH  
WEINHEIM/BERGSTR.

Soeben erschien:

Holleman — Wiberg

## Lehrbuch der anorganischen Chemie

Begründet von A. F. HOLLEMANN †

Von Dr. Dr. h. c. Dr. h. c. EGON WIBERG, Professor an der Universität München

71.—80., völlig umgearbeitete und stark erweiterte Auflage

mit einem Anhang Chemiegeschichte, Raumbilder-Erläuterungen, einem Tabellen-Anhang, sowie 216 Figuren und einer Beilage von 37 Struktur-Bildern in stereoskopischer Darstellung.

Groß-Oktav. XXXII, 1209 Seiten. 1971.

Werkstoff DM 58,—

Der Text der 71.—80. Auflage des Lehrbuches wurde völlig umgestaltet und stark erweitert, so daß ein neues Werk entstanden ist, das sich jetzt nicht mehr — wie bisher, nur an den Anfänger, sondern auch an die Fortgeschrittenen der Chemie wendet.

Das Buch gliedert sich in vier große Hauptteile:

- A: Atom und Molekül
- B: Hauptgruppen des Periodensystems
- C: Nebengruppen des Periodensystems
- D: Lanthaniden und Actiniden

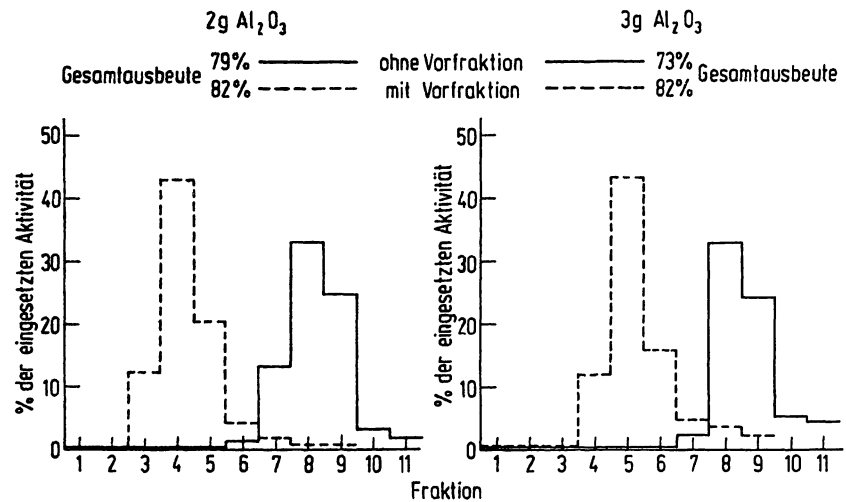
Den Abschluß des Buches bilden: ein chemiegeschichtlicher Anhang, ein Anhang mit Erläuterungen zur angefügten Raumbilder-Beilage und ein Tabellen-Anhang. Die Atomgewichte, Elementhäufigkeiten, physikalische Daten und atomaren Konstanten entsprechen dem neuesten Stand.

Die Anzahl der Abbildungen, Tabellen und tabellarischen Überblicke wurde beträchtlich erhöht. Die Raumbilder-Beilage wurde um 6 Atomstrukturen vermehrt.



Walter de Gruyter & Co · Berlin 30

Abb. 4  
Elutionsprofil von Adrenalin nach Adsorption an Aluminiumoxid mit Vorelution (gestrichelte Linie) und ohne Vorelution (durchgezogene Linie)



scharf, sondern es „tailt“. Je eher die Elution einsetzt, desto mehr wird noch von der zu bestimmenden Substanz miterfaßt.

### Anwendung der Methode

Das beschriebene Verfahren wurde bei der Analyse von einigen 3-Stunden-Urinproben aus einer Versuchsreihe über den Einfluß von Licht-Dunkel-Wechsel als Zeitgeber für circadiane Rhythmen (27) und zur Bestimmung der Ausscheidung der Katecholamine im 24-Stunden-Urin angewandt. Außerdem wurde die Ausscheidung der Katecholamine und der Vanillinmandelsäure bei einem operativ gesicherten Phäochromocytom bestimmt.

### Tagesgang

In Abbildung 5 ist das Ergebnis der Analyse von 3-Stunden-Urinproben von einer Versuchsperson wiedergegeben, und zwar für Adrenalin (unten), Noradrenalin (Mitte) und Dopamin (oben).

Bei diesem Versuch durfte die Versuchsperson während der beiden ersten Versuchstage nachts durchschlafen. In den beiden darauffolgenden Tagen wurde sie nachts in dreistündigem Abstand geweckt. Auffallend ist die höhere Dopaminausscheidung in den Nachtstunden während der beiden letzten Versuchstage.

### Normalwerte

Die 24-Stunden-Urinproben stammen von einer Stichprobe von 47 gesunden Frauen und 51 Männern im Alter zwischen 18 und 65 Jahren, die ihren normalen Beschäftigungen nachgingen. Die Einnahme von Medikamenten war drei Tage vor Sammelbeginn untersagt, ebenso der Verzehr von Schokolade, vanillehaltigen Speisen, Tonic Water und Bananen. Rauchen und mäßiges Trinken von Alkohol waren erlaubt. GREEN und WALKER (28) haben allerdings jüngst in einer Kurzmitteilung dargelegt, daß diätetisch zugeführtes Vanillin die Vanillinmandelsäure-Bestimmung (Oxydation mit Natrium-meta-perjodat) nicht stört. Während des Sammelns wurden die Proben kühl aufbewahrt. Nach Be-

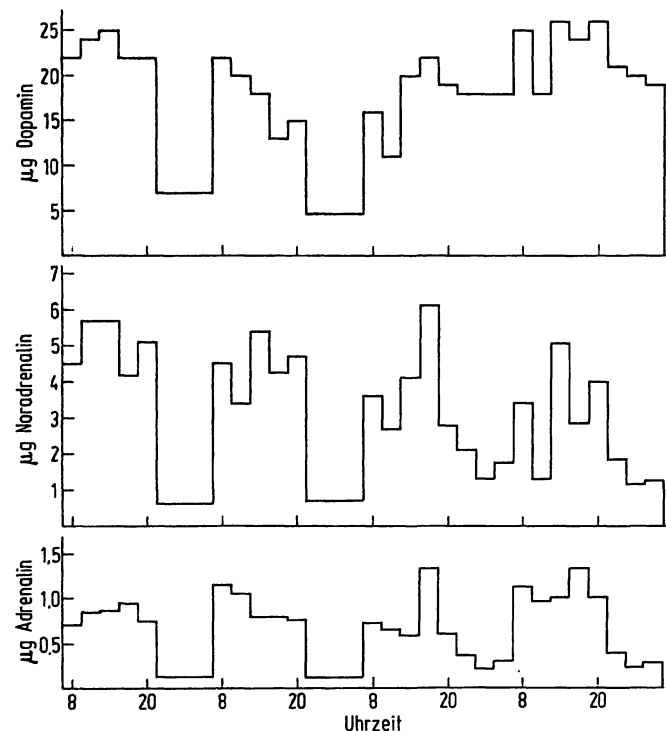


Abb. 5  
Tageszeitliche Änderung der Adrenalin-, Noradrenalin- und Dopamin-ausscheidung bei einer Versuchsperson an 4 aufeinanderfolgenden Versuchstagen

endigung der Sammelperiode wurden die Urine mit Salzsäure (10 ml 6 N HCl/l Urin) angesäuert und bis zur Analyse bei  $-28^{\circ}$  in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt. Wie eingangs erwähnt, wurden in dem gleichen auf pH 6,0 eingestellten Eluat Noradrenalin, Gesamtkatecholamine und Dopamin bestimmt. Außerdem wurde in einem auf pH 2,8 eingestellten aliquotierten Teil der Probe Adrenalin bestimmt.

Die Ausscheidung der genannten Verbindungen im 24-Stunden-Urin des Normalkollektivs — nicht korrigiert auf eine mittlere Wiederfindung von 80 Prozent — ist in Abbildung 6 in Abhängigkeit vom Alter wiedergegeben. In einer vorhergehenden Arbeit wurden die Werte der Vanillinmandelsäure-Ausscheidung in den gleichen 24-Stunden-Urinproben veröffentlicht (29).

Die Vanillinmandelsäureausscheidung war nicht altersabhängig. Wie Abbildung 6 zeigt, liegt auch keine Altersabhängigkeit der Ausscheidung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin vor.

Der Normalbereich der 24-Stunden-Ausscheidung ist in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Auffällig ist, daß der Median für alle Bestandteile bei den Frauen niedriger liegt als bei den Männern. Dies gilt auch für die Vanillinmandelsäureausscheidung (29). Allerdings ist der Lageunterschied nur für die Adrenalin- und Dopaminausscheidung statistisch signifikant (Wilcoxon-Test,  $P = 0.01$ ). Da aber bei allen untersuchten Bestandteilen der Median für die weibliche Stichprobe niedriger ist als für die männliche, ist die Vermutung

berechtigt, daß — auch bei nicht statistischer Signifikanz — die Ausscheidung der Frauen statistisch gesehen doch niedriger ist. Da die Differenzen im Vergleich zur biologischen Streuung zum Teil sehr gering sind, kann man vermuten, daß bei einer größeren Stichprobe dieser Befund für alle Bestandteile statistisch zu sichern wäre.

Erwähnt sei, daß in der von KÄRKI (23) mit einer biologischen Methode gewonnenen Stichprobe in der gleichen Altersgruppe Frauen ebenfalls eine statistisch signifikant niedrigere Adrenalinausscheidung haben als Männer, während die Differenz bei der Noradrenalinausscheidung nicht statistisch signifikant ist (gleicher Test, gleiches Testniveau).

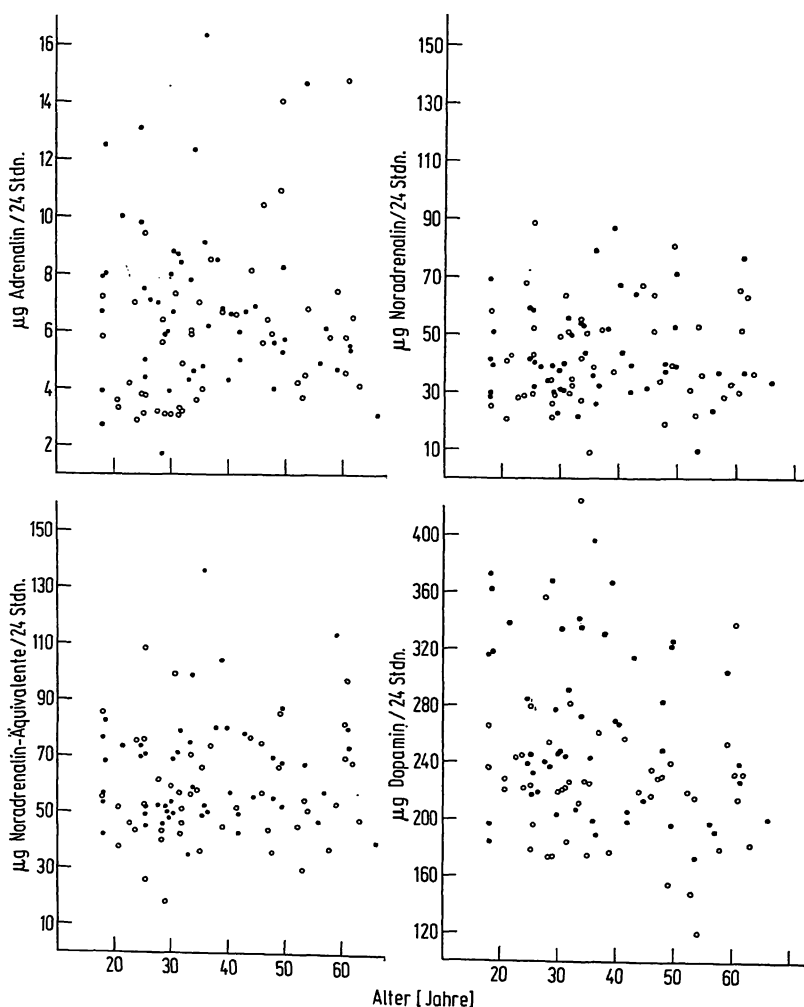


Abb. 6

Ausscheidung von Adrenalin, Noradrenalin, Gesamtkatecholaminen und Dopamin im 24-Stunden-Urin bei 47 Frauen (Kreise) und 51 Männern (Punkte) in Abhängigkeit vom Alter

Tab. 7  
Normalbereich der Ausscheidung von Adrenalin, Noradrenalin, Gesamtkatecholaminen und Dopamin im 24-Stunden-Urin. Die in Klammern angegebenen Werte sind hinsichtlich des Dopaminstörereinflusses korrigiert

Bestandteil	Männer n = 51		Frauen n = 47		Gesamt n = 98	
	Median (µg)	96-Perzentil (µg)	Median (µg)	96-Perzentil (µg)	Median (µg)	96-Perzentil (µg)
Adrenalin	6,6	2,7	4,6	2,9	5,8	2,7
		14,6		9,4		14,6
Noradrenalin	40 (36)	22 (19) 88 (75)	37 (34)	19 (16) 81 (77)	39 (36)	19 (16) 88 (83)
Gesamt-Katecholamine	58	40	56	30	56	35
		114		99		108
Dopamin	247	184	226	150	234	155
		374		357		374

Tab. 8

Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten (linke obere Hälfte Frauen — rechte untere Hälfte Männer) der bestimmten Verbindungen. Die in Klammern angegebenen Werte sind die entsprechenden Rang-Korrelationskoeffizienten

Bestandteil	Adrenalin	Noradrenalin	Dopamin	Gesamtkatecholamine	Vanillinmandelsäure
Adrenalin	1	0,016 (0,017)	0,068 (0,150)	0,366 (0,263)	0,330 (0,261)
Noradrenalin	0,039 (0,151)	1	0,216 (0,152)	0,849 (0,851)	0,294 (0,299)
Dopamin	0,298 (0,321)	0,554 (0,596)	1	0,269 (0,273)	0,186 (0,169)
Gesamtkatecholamine	0,499 (0,440)	0,809 (0,819)	0,680 (0,673)	1	0,239 (0,357)
Vanillinmandelsäure	0,127 (0,053)	0,583 (0,562)	0,528 (0,498)	0,579 (0,536)	1

Als weitere Frage interessierte, inwieweit die gemessenen Größen, die jeweils aus derselben Probe bestimmt wurden, miteinander korreliert sind. Es wurden die Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten und die Rang-Korrelationskoeffizienten berechnet (30). In Tabelle 8 sind die berechneten Korrelationskoeffizienten für Männer und Frauen getrennt zusammengefaßt.

Die Rang-Korrelationskoeffizienten stimmen mit den Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten weitgehend überein. Nach diesen Werten liegt keine Korrelation der Adrenalin- und Noradrenalinausscheidung vor. Dies erklärt sich aus der unterschiedlichen Herkunft der beiden Substanzen. Das im Urin ausgeschiedene Adrenalin stammt weitgehend aus dem Nebennierenmark und das Noradrenalin aus dem sympathischen Nervensystem (31). Die hohen Korrelationskoeffizienten für Noradrenalin und Gesamtkatecholamine sind methodisch bedingt, denn das Noradrenalin macht den Hauptteil bei der Gesamtkatecholaminbestimmung aus. Auffallend ist der Unterschied der Korrelationskoeffizienten für die Vanillinmandelsäureausscheidung mit der Noradrenalin-, Dopamin- und Gesamtkatecholaminausscheidung für Männer und Frauen. Eine schlüssige Erklärung kann nicht gegeben werden.

#### Kasuistik

Bei der Analyse unserer Einsendungen konnte nach relativ kurzer Zeit ein Fall mit einer Störung des Katecholaminstoffwechsels festgestellt werden<sup>13)</sup>. Die Werte der 24-Stunden-Ausscheidung sind in folgender Tabelle wiedergegeben.

Tab. 9

24-Stunden-Ausscheidung der Katecholamine und der Vanillinmandelsäure bei einem 30 Jahre alten Patienten mit operativ gesichertem Phäochromocytom der rechten Nebenniere

u. d. N. = unter der Nachweisgrenze

Zeitpunkt der Bestimmung	Adrenalin µg/24 Stdn	Noradrenalin µg/24 Stdn	Vanillinmandelsäure mg/24 Stdn	Dopamin µg/24 Stdn
8 Wochen präoperativ	u. d. N.	910	11,0	276
8 Monate postoperativ	11,3	85	4,4	227

<sup>13)</sup> Herrn Dr. P. HEFEL, Dornbirn/Österreich möchte ich für die Zusendung der Probe danken.

Bei dem 30jährigen Patienten mit einem seit längerer Zeit bestehenden Dauerhochdruck waren sowohl die Vanillinmandelsäure- wie auch die Noradrenalinausscheidung erhöht. Operativ konnte ein Phäochromocytom der rechten Nebenniere gesichert werden.

#### Die diagnostische Bedeutung der Katecholaminbestimmung

Häufig wird die Frage gestellt, ob in der Routinediagnostik zur Erkennung von Störungen des Katecholaminstoffwechsels die Bestimmung der Vanillinmandelsäure oder der Katecholamine durchgeführt werden soll. K. ENGELMAN, der in einer Übersicht von 62 Fällen mit Phäochromocytom referiert, kommt zu dem Schluß, daß in den meisten Fällen eine einmalige Bestimmung der Vanillinmandelsäure oder der Metanephrene ausreicht, um die Diagnose zu sichern (32). Außerdem ist die Bestimmung der Vanillinmandelsäure weniger stör anfällig als die der Katecholamine. Als zusätzliche Sicherung zum Ausschluß falsch negativer Ergebnisse ist für Routineuntersuchungen die Bestimmung der Gesamtkatecholamine zu empfehlen. Die Bestimmung der Gesamtkatecholamine hat allerdings den Nachteil, daß sie in erster Linie das Noradrenalin erfaßt und gegenüber weniger stark erhöhten Ausscheidungen von Adrenalin und Dopamin unempfindlich ist. Da es sich beim Phäochromocytom meist um Noradrenalin produzierende Tumoren handelt, ist dieser Nachteil nicht so schwerwiegend. Es sei allerdings darauf hingewiesen, daß bei Tumoren, die sich von Neuroblasten oder Sympathocyten ableiten, die 3-O-methylierten Derivate von Dopa, Dopamin und Noradrenalin vermehrt ausgeschieden werden (33). In diesem Fall sollte man außerdem die Ausscheidung der Homovanillinsäure ermitteln.

Herrn Privatdozent Dr. Dr. STAMM, Leiter der Klinisch-chemischen Abteilung, gilt mein persönlicher Dank für die Förderung und die wertvollen Diskussionen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. E. HANSERT, Leiter der Biometrischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung und Durchführung der Berechnung der Korrelationskoeffizienten.

Fräulein JURTA-MARIA QUANTE sei für ihre sorgfältige Mitarbeit gedankt.

## Literatur

1. WEIL-MALHERBE, H., und L. B. BIGELOW, *Analytic. Biochem.* 22, 321 (1968). — 2. WEIL-MALHERBE, H., *Meth. Biochem. Analysis* 16, 302 (1968). — 3. CROUT, J. R., *Stand. Meth. Clin. Chem.* 3, 62 (1961). — 4. HÄGGENDAHL, J., *Scand. J. clin. Laborat. Invest.* 14, 537 (1962). — 5. BERTLER, Å., A. CARLSSON und E. ROSENGREN, *Acta physiol. Scand.* 44, 273 (1958). — 6. EULER, U. S. v., und F. LISHAJKO, *Acta physiol. Scand.* 45, 122 (1959). — 7. UDENFRIEND, S. in: *Fluorescence Assay in Biology and Medicine* Academic Press, New York (1964). — 8. MERRILLS, R. J., *Nature London* 193, 988 (1962). — 9. MERRILLS, R. J., *Analytic. Biochem.* 6, 272 (1963). — 10. HÄGGENDAHL, J., *Acta physiol. Scand.* 59, 242 (1963). — 11. VOCHTEN, R. F., und A. F. DE SCHAEFDRIYVER, *Experientia* Basel 22, 772 (1966). — 12. EULER, U. S. v., und I. FLODING, *Acta physiol. Scand.* 33, Suppl. 118, 45 (1955). — 13. ROBINSON, R. L., und D. T. WATTS, *Clin. Chem. New York* 11, 986 (1965). — 14. HATHAWAY, P. W., L. JAKOI, W. G. TROYER jr. und M. D. BOGDONOFF, *Analytic. Biochem.* 20, 466 (1967). — 15. SAMPSON, P. A., *Clin. Chem. New York* 13, 806 (1967). — 16. VIKTORIA, J. K., A. BAUKAL und F. W. WOLFF, *Analytic. Biochem.* 23, 513 (1968). — 17. MABRY, C. Ch., und P. W. WARTH, *Amer. J. clin. Path.* 52, 57 (1969). — 18. VALORI, C., C. A. BRUNORI, V. RENZINI und L. COREA, *Analytic. Biochem.* 33, 158 (1970). — 19. WISSER, H., und D. STAMM, *diese Z.* 7, 631 (1969). — 20. WISSER, H., und D. STAMM, *Z. analyt. Chem.* (im Druck). — 21. ANTON, A. H., und D. F. SAYRE, *J. Pharmacol. Exper. Therap. Baltimore* 138, 360 (1962). — 22. KAISER, H., *Z. analyt. Chem.* 209, 1 (1965). — 23. KÄRKI, N. T., *Acta physiol. Scand.* 39, Suppl. 132 (1956). — 24. WEIL-MALHERBE, H., *diese Z.* 6, 161 (1964). — 25. STUDNITZ v., W., *Klin. Wschr.* 40, 163 (1962). — 26. CHANG, C. C., *Int. J. Neuropharmacol.* 3, 643 (1964). — 27. ASCHOFF, J., M. FATRANSKA, H. GIEDKE, P. DOERR, D. STAMM, H. WISSER (in Vorbereitung). — 28. GREEN, M., und G. WALKER, *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 29, 189 (1970). — 29. WISSER, H., und D. STAMM, *diese Z.* 8, 21 (1970). — 30. WEBER, E., in: *Grundriß der biologischen Statistik* VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 6. Auflage (1967). — 31. EULER, U. S. v., S. HELLNER-BJÖRKMAN und I. ORWEN, *Acta physiol. Scand.* 33, Suppl. 118, 10 (1955). — 32. SJOERDSMA, A., K. ENGELMAN, TH. WALDMANN und L. COOPERMAN, *Ann. Int. Med.* 65, 1302 (1966). — 33. GJESSING, L. R., *Adv. Clin. Chemistry* 11, 81 (1968).

Dr. Dr. H. Wisser  
8000 München 23  
Kraepelinstr. 10